

**Zur Technik der Chromosomenanalyse
an Blut und Knochenmarkkulturen**

Vera I. Maitinsky

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Gerhard Weber

Zur Technik der Chromosomenanalyse an Blut und Knochenmarkkulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Vera I. Maitinsky
aus Buenos Aires

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. D. VOGT
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. WEBER
Dekan:	Prof. Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1964



I n h a l t

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	3
II. Übersicht über Methoden zur Darstellung von Chromosomen im Lichtmikroskop.	8
III. Eigene Untersuchungen	22
III. a) Methodik	22
III. b) Bisherige Ergebnisse	27
IV. Diskussion	36
V. Zusammenfassung	38
VI. Bildteil	
VII. Literatur	

I. Einleitung

Seitdem vor 40 Jahren BRIDGES (3) die chromosomale Aberration der Drosophila mit ihren phänotypischen Eigenschaften in Beziehung setzte, beschäftigt sich die Zytogenetik mit der Technik der Chromosomengewinnung und Analyse.

Die erste Chromosomendarstellung wurde 1882 von FLEMMING (12) durchgeführt. Eine eindeutige Zahl konnte er nicht festlegen, jedoch machte er bereits die fundamentale Feststellung, daß eine konstante Chromosomenzahl ein spezifisches Artmerkmal sei.

HANSEMAN (21) berichtete 1891 über eine Zählung von Chromosomen "in normalem menschlichen Gewebe", wobei er feststellt, daß die Chromosomenzahl sicher höher wie 24 sei. In der Folgezeit beschäftigten sich eine Reihe von Untersuchern mit diesem Problem (FLEMMING 1898, 12; DUESBERG 1905, 7; GUYER 1910, 18; MONTGOMERY 1912, 38). Sie hielten 24 für die diploide Chromosomenzahl beim Mann und 25 oder 26 bei der Frau. Einen großen Fortschritt erbrachte die Arbeit WINIWARTER's (58) 1912, in der er in Spermatozyten I. Ordnung 23' Autosomenpaare und ein unpaares X-Chromosom fand. Grundlegend wurden Untersuchungen von PAINTER (39, 40, 41, 42) an frisch extirpierten Hodengewebe zweier Neger, wobei er das Y-Chromosom entdeckte und den XY-Mechanismus für die menschliche Geschlechtsbestimmung daraus postulierte. Seit PAINTER (39, 40, 41, 42) ist an der Tatsache des XY-Mechanismus kaum noch zu zweifeln, da er dieses heteromorphe Chromosomenpaar nicht nur morphologisch beschrieb, sondern auch ein den Autosomen gegenüber andersartiges Teilungsverhalten zeigen konnte. Die heutigen Autoren bezeichnen dies als Distanzkonjugation.

Eine weitere Untermauerung des XY-Mechanismus erbrachten Arbeiten von MATTHEY 1936 und 1951 (36), der die Existenz eines Y-Chromosoms bei allen bisher untersuchten Säugern für erwiesen hält.

Jedoch die These einer normalen Chromosomenzahl beim Menschen von 48 blieb bis 1956 unangefochten. In diesem Jahr berichteten TJIO und LEVAN (53), daß nach sorgfältiger Prüfung von 265 Zellen aus Kulturen embryonaler menschlicher Lungenfibroblasten nur in 4 Fällen 48 Chromosomen gezählt werden konnten. Die restlichen Zellen hatten 46 Chromosomen. Damit stellten die Forscher zum ersten Mal die Zahl der menschlichen Chromosomen fest, die heute allgemein als richtig gilt. Gleichzeitig teilen die Autoren unveröffentlichte Befunde von HANSEN-MELANDER, MELANDER und KULLANDER mit, die an Lebermitosen abortierter menschlicher Embryonen ebenfalls 46 statt 48 Chromosomen fanden.

Die Autoren verbesserten die bisher angewandte Technik zur Chromosomendarstellung entscheidend dadurch, daß sie mit Zusatz von Colchicin erreichen konnten, die Zellteilung in der Metaphase zu hemmen. Dieses Verfahren erbrachte eine größere Anzahl von Zellteilungsstadien. Die Reproduktion wurde dadurch erleichtert, daß die gezüchteten Zellen mit hypotonischen Lösungen behandelt wurden und sich dadurch besser auf dem Objektträger ausbreiteten.

An Kulturen aus menschlichem Hoden wurde die Zahl von 46 Chromosomen durch FORD und HAMMERTON (13) bestätigt. Sie führten die "squash"-Methode ein, bei der die Zellen zur besseren Ausbreitung der Chromosomen durch kräftigen Druck auf die Deckgläser zerdrückt werden.

JACOBS und LAJTHA (25) haben im Jahre 1958 die Chromosomen aus Knochenmarkszellen in vitro studiert. TJIO und PUCK (54, 55) und CHU und GILES (5) bestätigten ebenfalls eine Chromosomenzahl von 46 in Zellen menschlicher Gewebe.

Im Jahre 1960 gelang es MOORHEAD et al. (37) Zellkulturen aus den weißen Zellen des peripheren Blutes zu erhalten, nachdem durch Sedimentation eine Trennung von Erythrozyten und Leukozyten erreicht wurde. Diese Moorhead'sche Methode eröffnete der Chromosomenforschung neue Wege, die dann zur breiten Anwendung in Kliniken und theoretischen Instituten führten.

Die Möglichkeit, die menschlichen Chromosomen nach ihrer Größe und der Lage ihrer Centromere einzuordnen, öffnete der Genetik wiederum neue Wege. 1959 zeigten LEJEUNE et al. (31, 32) zum ersten Mal, daß sich beim Mongolismus eine konstante Chromosomenaberration fand.

JACOBS und STRONG (26) und FORD et al. (14) beschrieben Fälle von Klinefelter Syndrom mit 47 Chromosomen und einem XXY-Mosaik. In mehreren Fällen von Turner Syndrom wurden von FORD et al. (15) 45 Chromosomen mit einer XO-Konstitution festgestellt.

Bald zeigte sich, daß die Zahl der Mißbildungen und Erkrankungen, die mit chromosomalen Anomalien in Zusammenhang stehen, viel größer ist als man zuerst vermutete. Chromosomenaberrationen wurden nicht nur bei kranken, sondern gelegentlich auch bei gesunden Menschen gesehen. Diese Erkenntnis hatte zur Folge, daß eine große Zahl von Kliniken und Forschungsinstituten sich bemühten, diese neue Technik der Chromosomenanalyse zu erlernen und einzuführen.

1960 wurden in Denver (27) einheitliche Kriterien zur Nomenklatur und Erkennung der einzelnen Chromosomen aufgestellt. Zu ihrer Identifikation wurden ihre Länge, die relative Lage der Centromeren und das Verhältnis zwischen langem und kurzem Arm herangezogen. Es gibt 7 große Gruppen, welche im "Denver System" fortlaufend numeriert werden. PATAU (44) schlug für diese Gruppen folgende Kennzeichnung mit Buchstaben vor:

Gruppe A (1-3) große Chromosomen. Das Centromer befindet sich in der Mitte.

Gruppe B (4-5) große Chromosomen. Das Centromer ist etwas aus der Mitte herausgerückt.

Gruppe C (6-12 und X) mittelgroße Chromosomen. Das Centromer ist etwas aus der Mitte herausgerückt.

Gruppe D (13-15) mittelgroße Chromosomen. Das Centromer liegt exzentrisch. Gelegentlich findet sich am kürzeren Arm ein "Satellit".

Gruppe E (16-18) kurze Chromosomen. Das Centromer befindet sich in der Mitte oder ist etwas aus der Mitte herausgerückt.

Gruppe F (19-20) sehr kurze Chromosomen. Das Centromer liegt in der Mitte.

Gruppe G (21-22 und Y) sehr kurze Chromosomen. Das Centromer liegt exzentrisch. Gelegentlich findet sich am kürzeren Arm ein "Satellit".

Die großen Gruppen von 1 - 7 sind leicht zu erkennen, jedoch ist die exakte Identifikation der einzelnen Chromosomen sehr schwierig und oft unmöglich. PATAU (43) meint, daß nur die Chromosomen der Gruppen A (1, 2 und 3) und E (16, 17 und 18)

mit einiger Sicherheit erkannt werden können. Wenn man die homologen Chromosomen paaren kann, so ist es möglich, die Gruppen B (4 und 5) und F (19 und 20) zu erkennen. Die Identifikation der einzelnen Chromosomen der Gruppe C (6 bis 12 und X) ist fast unmöglich. Um die Gruppen D und G zu unterscheiden, wurden die Satelliten als Unterscheidungsmerkmal herangezogen (10, 11).

Da es technisch sehr schwierig ist, die Satelliten darzustellen, kann dieses Kriterium nicht zuverlässig verwendet werden. Auch ist es nicht einfach, die Geschlechtschromosomen zu erkennen. Die Festlegung des Geschlechts ergibt sich daraus, daß ein normaler weiblicher Karyotyp 16 Chromosomen in der Gruppe C (XX) und 4 in der Gruppe G hat. Ein männlicher Chromosomensatz hingegen wird in der Gruppe C nur 15 Chromosomen aufweisen (X) und in der Gruppe G 5 (X) Chromosomen. FATAU (43) hält es für ratsam, nur die Gruppen zu identifizieren und nicht die einzelnen Chromosomen. Besonders bei der Beschreibung chromosomaler Anomalien sollte man nie die Aberration bestimmten Chromosomen zuschreiben; es sei denn, die Identifikation ist gesichert.

In der hier vorliegenden Arbeit wird ein Überblick der technischen Fortschritte in den letzten Jahren gegeben. Da die Darstellung von Chromosomen zur Diagnose verschiedenartigster Krankheitsbilder zunehmende Bedeutung gewinnt, erschien es wichtig, eine Zusammenstellung der bisher gebräuchlichen Methoden zu geben. Im zweiten Teil wird über eine Methodik berichtet, die in Anlehnung an die Moorhead'sche (37) Technik entwickelt wurde. Herrn Professor C. Benda sei an dieser Stelle für seine tatkräftige Unterstützung bei diesem Vorhaben an der Kinderpoliklinik der Universität München sehr herzlich gedankt.

II. Übersicht über Methoden zur Darstellung von Chromosomen im Lichtmikroskop

Die gemeinsame Grundlage der z.Zt. gebräuchlichen Methoden beruht auf Züchtung menschlicher Gewebe in Form von Gewebekulturen. Nach KOSENOW (29) werden bisher am häufigsten Haut, Knochenmark sowie Leukozyten des strömenden Blutes verwandt.

Zur Züchtung der verschiedenen Zellarten wurden ganz unterschiedliche Nährmedien benützt. Im Folgenden sind diejenigen Medien, die von den verschiedenen Autoren als am geeignetsten zur Züchtung angegeben wurden (HARNDEN, 22), kurz zusammengestellt:

<u>Plasma</u>	Frisches Hühner Plasma ohne Antikoagulantien
<u>Hühner Embryonen Extrakt</u>	Angefertigt aus 10 Tage alten Hühner Embryonen nach der Methode von BRYANT, EARLE et al. (4) oder nach HANKS und WALLACE (20). Die Lösung ist ein steriles zellfreies Ultrafiltrat, bei -10°C bis zu 2 Wochen haltbar.
<u>Medium 199</u>	Hergestellt von Glaxo Laboratories (Greenford, England). Die Lösung ist kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 10 zu verdünnen.
<u>Menschliches Serum</u>	Koaguliertes AB Blut wird für 30 min. bei 2 500 U/min. zentrifugiert und das Serum unter Überdruck filtriert, bei -10°C bis zu einem Monat haltbar.

Hank's Lösung

Lösung A:	NaCl	160,0 ml
	KCl	8,0 ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,0 ml
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,0 ml
	Aqua bidest.	800,0 ml

wird mit einer Lösung von CaCl₂ sicc. 2,8 g in Aqua bidest. ad 100,0 ml gemischt und auf 1000 ml aufgefüllt.

Lösung B:	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3,04 ml
	KH ₂ PO ₄	1,2 ml
	Glukose	20,0 ml
	Aqua bidest.	800,0 ml
	0,4 %iges Phenolrot	100,0 ml
	Aqua dest. ad	1000,0 ml

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Hank'schen Lösung werden Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt, 18 Teile Aqua bidest. zugesetzt und anschließend im Autoklaven sterilisiert.

Trypsin-Versene
Lösung

wird aus flg. 3 Lösungen hergestellt:

- Hank's Lösung ohne CaCl₂ und MgSO₄
- Difco (Detroit, USA) Bacto Trypsin 1 :
250 als 1 %ige Lösung in Hank's Lösung bei einem pH von ungefähr 7,4
- Diamino-äthan-tetraessigsäure (Versene) als 1 %ige Lösung

Kurz vor Gebrauch werden b) und c) bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % in a) gemischt. Anschließend wird mit NaHCO₃ auf 7,4 gepuffert.

Nährmedium A

Bestehend zu 20 % aus Hühnerembryonen-Extrakt, zu 20 % aus menschlichem Serum und zu 60 % aus Medium 199.

Nährmedium B Bestehend zu 10 % aus Hühnerembryonen-Extrakt, zu 20 % aus menschlichem Serum und zu 70 % aus Medium 199.

Die Nährmedien bieten den verschiedensten Keimen einen guten Nährboden. Zur Verhütung bakterieller Verunreinigungen werden von allen Autoren den Nährlösungen Antibiotica in Form von Penicillin (in Dosen von 100 E/ml) und Streptomycin (0,2 ml) zugesetzt.

Die Beobachtung, daß Phytohämagglutinin (PHA), das aus einem Extrakt von *Phaseolus vulgaris* gewonnen wird (HALL, 19), einerseits die roten Blutkörperchen agglutiniert und andererseits die Mitoserate der Leukozyten heraufsetzt, führte dazu, daß die meisten Autoren der Nährlösung PHA in Konzentrationen von 0,03 - 0,05/ml zusetzen. Durch elektrophoretische Analyse wurde von ROBBINS et al. (48) festgestellt, daß es sich bei PHA um mindestens eine Hauptfraktion und 13 weiteren verschiedene Proteine handelt. Es ist bisher nicht möglich, die oben erwähnten Eigenschaften Einzelnen dieser 14 Proteine eindeutig zuzuordnen.

Zur Mitosehemmung in der Metaphase wird von allen Autoren 2 - 4 Stunden vor Beendigung der Inkubation Colchicin in Konzentrationen von 0,0005 - 0,08 μ /ml zugesetzt. Die zeitliche Einwirkung dieses Pharmakons muß begrenzt sein, da sonst die Chromosomen schrumpfen, die Centromere sich aus ihrer ursprünglichen Lage entfernen und somit ein falsches morphologisches Bild entsteht.

STEWART und KEMP (52) entwickelten einen einfachen Apparat zur automatischen Colchicininjektion. Das Prinzip der Anordnung beruht darauf, daß die Stempel der Spritzen, die

Colchicin enthalten, mit einem Laboratoriumswecker in der Weise gekoppelt werden, daß die Uhr zum beliebigen Zeitpunkt die Injektion auslösen kann.

In der Folge werden die Methoden der einzelnen Autoren beschrieben. Ihre Zusammenstellung geschah nach Art der jeweils verwandten Gewebe, da zu berücksichtigen ist, daß einerseits die Wachstumsbedingungen der Zellkulturen und andererseits die Zeitspanne, in der die Metaphase erreicht wird, bei den verschiedenen Zellarten differiert.

1. Haut (I)

HARNDEN (22) beschreibt folgende Technik zur Gewinnung von Chromosomen aus einer Hautkultur:

3 x 4 mm große Hautstücke werden exzidiert und mit Medium 199 versetzt, so daß sie gerade bedeckt sind. Nach 24 Stunden wird in 1 mm große Stücke geschnitten. Es wird nun zu gleichen Teilen Hühnerembryonen-Extrakt zugesetzt unter Beifügung von 2 ml Medium A. Die Kultur wird nun mit 5 % CO₂-Gehalt in der Luft bei 37°C inkubiert. Jeden zweiten Tag wird das flüssige Nährmedium gewechselt. Nach 10 - 14 Tagen wird die Nährlösung verworfen und durch 2 ml einer 0,05 %igen Trypsin-Versene-Lösung ersetzt, welche eine Temperatur von 37°C hat. Nach 20 min. wird die Zellsuspension mit 500 U/min. 5 min. lang zentrifugiert. Der zelluläre Rückstand wird erneut in das oben erwähnte Medium A suspendiert. Bei großem Zellreichtum verwendet man eine 8 cm große Kulturflasche mit 10 ml Medium; ansonsten genügt eine 5 cm große Flasche, die 2 ml Nährmedium enthält. Die Flaschen werden luftdicht verschlossen und weiter bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde beginnen die Zellen zu sedimentieren. 3 - 4 Tage später sieht man am Grund

der Kulturflasche einen dichten Zellteppich. Bei zu geringem Wachstum der Kultur wird das Medium abpipettiert und der Zellrückstand mit 10 ml raumwarmer Trypsin-Versene-Lösung für 10 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend 5 min. zentrifugieren bei 500 U/min. Die Zellen werden in Medium B suspendiert, bis man eine Verdünnung von 1 : 10 bis 1 : 20 erreicht hat. Bei erneuter Inkubation wird das Medium dreimal wöchentlich gewechselt und eine Kultur pro Woche abgeimpft. Diese "Subkulturen" können über einige Monate weiter geführt werden.

Sollen die Zellen für cytologische Untersuchungen verwendet werden, so muß mit 5 ml Nährmedium B in einer 9 cm großen Petri-Schale eine ziemlich dichte Kultur (2×10^4 Zellen/ml) angelegt werden. Die Zellen müssen mit 5 %igen CO_2 -Gehalt der Luft wachsen. Genügend Luftfeuchtigkeit wird durch ein offenes Schälchen Aqua dest. erhalten. 22 Stunden nach abimpfen einer Subkultur wird Colchicin in einer Konzentration von 0,0005 % zugesetzt. Nach 6 Stunden erfolgt die weitere Behandlung nach einer modifizierten Methode von ROTHFELS und SIMINOVITCH (50): 15 min. lange Inkubation bei 37°C in einer 25 %igen hypotonen Hank's Lösung. Nach Abgießen der Hank's Lösung werden die Kulturen 2 sec. mit 2 %iger Osmiumsäure bedampft. Nun wird mit Eisessig und absolutem Alkohol (1 : 3) 1 min. lang gewaschen und die Kultur weitere 30 min. in diesem Gemisch belassen. Der Vorteil dieser Modifikation der Methode nach ROTHFELS und SIMINOVITCH (50) besteht darin, daß die Zellmembranen erhalten bleiben, wodurch die Chromosomen nicht ausstreuen. Die Einwirkungsdauer der Osmiumsäure muß streng auf 2 sec. begrenzt werden, da sonst die Ausbreitung der Chromosomen in Mitleidenschaft gezogen wird.

Ein mit Silikon vorbehandelter Objektträger, auf dem ein

Zellausstrich gemacht worden ist, wird 12 Stunden in folgender Färbelösung belassen: 2 g Orcein werden in 1400 ml 70 %iger Milchsäure und 99 %iger Essigsäure zu gleichen Teilen gelöst. Anschließend wird mit 45 %iger Essigsäure gewaschen. Die Objektträger werden mit Euparal nach aufsteigender Alkoholreihe eingedeckt.

2. Haut (II)

HIRSCHHORN und COOPER (23) entwickelten 1961 folgende Methode: An beliebiger Stelle wird ein Hautstück in der Größe von ca. 5 x 4 x 2 mm aseptisch exzidiert. Fragmente von 0,5 - 1,0 mm werden in steriler physiologischer NaCl-Lösung eingelegt und mit Nährmedium bedeckt. Die Nährflüssigkeit besteht aus: Difco 199 (7 %), AB-Serum von einem Spender (20 %), Hühnerembryonen-Extrakt (10 %) und Antibiotica. Nun wird bei 37°C unter Druck von 1 Atmosphäre einer 5 % CO₂ enthaltenden Luft inkubiert. Dreimal wöchentlich wird das Medium vorsichtig abpipettiert. Nach 1 - 3 Wochen, wenn das Wachstum seinen Höhepunkt erreicht hat, werden die Zellen mit einer Lösung von Versene und Trypsin zu gleichen Teilen in Hank's Lösung (ohne Ca oder Mg) versetzt. Nach dem Zentrifugieren wird der Zellrückstand erneut in sterilen Petrischalen für 3 - 4 Tage bebrütet. Nach Zusatz von 2 γ Colchicin in einer Konzentration von 0,0001 % weitere Inkubation für 3 - 4 Stunden. Die Kultur wird mit Orcein gefärbt, anschließend werden mit der "squash"-Methode Präparate hergestellt.

Nachdem durch LEVAN und BIESELE (33) nachgewiesen wurde, daß bei Vorbehandlung der Zellen mit Trypsin eine größere Anzahl von Chromosomen zerstört wird, erscheint es zweifelhaft, ob bei der Methode nach HARDEN (22) optimale Ergebnisse erzielt werden können. Der Vorteil der Methode nach HIRSCHHORN und

COOPER (23) scheint darin zu bestehen, daß die Zugabe von Trypsin erst im letzten Stadium des Zellwachstums erfolgt.

3. Peripheres Blut - Leukozyten (I)

Die Grundlage der unter II 3 - 9 beschriebenen Methoden ist die von MOORHEAD et al. (37) 1960 angegebene Technik, aus Zellen des peripheren Blutes Kulturen anzulegen. Die Kulturelemente werden dadurch gewonnen, daß man das durch Venenpunktion gewonnene periphere Blut in seine zellulären Bestandteile trennt und die Leukozyten mit einer Pippette in das Nährmedium überträgt. Daß sich die enddifferenzierten Zellen der myeloischen Reihe in vitro und unter dem Einfluß von PHA mitotisch teilen, ist umso ersteinlicher, als man bisher annahm, daß die Leukozyten nach Ausschwemmung aus dem Knochenmark ihre Vermehrungsfähigkeit verloren haben, worauf auch ihre kurze Lebensdauer hinzuweisen scheint.

AMALA CHAUDHURI (1) beschrieb 1963 folgende Methode zur Chromosomendarstellung aus Leukozyten des peripheren Blutes: Mit einer heparinisierten Spritze werden aus der Cubitalvene 5 - 10 ml Blut entnommen. Das Blut wird mit 0,1 ml Heparin vorsichtig vermischt. Zur Sedimentierung der Erythrozyten wird das Blut für 30 - 45 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend Entnahme von 10 ml Plasma. Dieses wird in einen sterilen Behälter eingebracht und mit 0,2 ml PHA (Difco) vermischt. Durch Zugabe von Medium 199 (Difco) wird die Zellzahl auf 1000 - 4000 pro mm³ eingestellt. Die auf diese Art gewonnenen Zellkulturen werden bei 37°C 72 Stunden lang inkubiert. Nach Zusatz von 0,04 µ/ml Colcemid erfolgt die Weiterbehandlung der Kulturen nach der üblichen Methode.

Wir sehen einen Vorteil dieser Methode darin, daß eine Zell-

zerstörung durch zentrifugieren vermieden wird. Die Wirkung des PHA besteht in dieser Versuchsanordnung lediglich in einer Erhöhung der Mitoserate.

4. Peripheres Blut - Leukozyten (II)

Eine weitere Methode zur Gewebezüchtung aus Leukozyten wurde von WECHSLER (57) angegeben. Die Gewinnung weißer Blutkörperchen erfolgt im wesentlichen ebenso wie bei der vorher beschriebenen Methode. Der Unterschied besteht darin, daß in das Kulturgefäß ein Deckglas eingebracht wird, welches von der Leukozytenkultur überwuchert wird. Nachdem bei 37°C 72 Stunden inkubiert wurde, werden 0,02 %/ml Colchicin hinzugesetzt und weitere 2 Stunden inkubiert. Das Nährmedium wird aus der Kultur entfernt und 0,84 %iges Natriumcitrat (35 min. bei 37°C) zugesetzt. Anschließend fixiert man mit Methanol und Eisessig (3 : 1). Nach einmaligem Wechsel der Fixierungsflüssigkeit, Lufttrocknung und Wässern mit Aqua dest. werden die Präparate nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Nach WECHSLER (57) eignet sich die Methode ebenfalls für Knochenmarks- und Lymphozytenkulturen. Gute Ergebnisse erzielte sie beim Versuch, Mitosestadien lebender Zellen photokinematographisch festzuhalten.

5. Peripheres Blut - Lymphozyten (I)

Die hier beschriebene Methode nach J.H. EDWARDS (8) unterscheidet sich in der Anlage der Kulturen und ihrer Auswertung nicht wesentlich von den bisher dargestellten Methoden. Die Resistenz der Lymphozyten, die eine weitaus längere Überlebenszeit haben als andere Blutzellen, ermöglicht es, Chromosomendiagnosen an Patienten zu stellen, die nicht in direkten

Kontakt mit einem cytologischen Labor gebracht werden können. Die Methode hat sich vor allem bewährt beim Nachweis erblicher Disposition des Mongolismus.

Das Verfahren beruht auf der sterilen Trennung weißer Blutkörperchen durch eine 6 %ige Dextranlösung. Die Lymphozyten bleiben mehrere Tage in der Nährflüssigkeit bei Temperaturschwankungen zwischen 0°C und der normalen Bluttemperatur lebensfähig.

Die Gewebekulturen werden nach der üblichen Methode von MOORHEAD et al. (37) angelegt. Die Zellen müssen gründlich gewaschen werden, da die Fixierflüssigkeit mit dem Dextran ausfällt. Hierzu bewährte sich, die Zellsuspension mit 4 - 5 %iger Sucrose-Lösung zu schichten und anschließend zu zentrifugieren.

Zur Anlegung einer Leukozytenkultur empfiehlt der Autor folgendes Material:

- a) 1 - 2 Spritzen, welche sterile Glasperlen enthalten
- b) 2 - 4 Nadeln
- c) 1 - 2 unsterile Korken
- d) 1 - 2 sterile Flaschen mit jeweils 4 ml 6 %iger Dextranlösung
- e) 1 - 2 sterile Schraubflaschen mit einem Gummiverschluß zur Injektion. Die Flaschen enthalten 15 ml Medium 199 bei 5 % CO₂-Gehalt der überständigen Luft
- f) 1 Reservespritze mit Glasperlen
- g) beschriftete Etikette für die Rückantwort.

Maßgabe der Glasperlen ist 0,5 cm Durchmesser mit einer zentralen Bohrung. Die Spritzen und die Kanülen werden vom Autor nur einmal verwendet. Der "Universal Container" für das Nährmedium hat sich bewährt. Um eine Konzentration von 4 % CO₂ in der Luft zu bekommen, genügt es, durch sterile

Watte das Kulturgefäß mit der letzten Fraktion der Ausatemungs-
luft zu beatmen.

Technik:

- a) Durch Venenpunktion werden 4 - 8 ml Blut entnommen.
- b) Nach dem Abspritzen der überstehenden Luft wird die Nadel mit einem Kork verschlossen.
- c) Die Kontrolle der Gerinnung erfolgt durch Beobachtung der Glasperlen. Wenn sich beim Schütteln der Spritze die Glasperlen nicht mehr bewegen, ist die Gerinnung vollständig.
- d) Korken und Nadel werden verworfen und 4 ml Dextranlösung mit einer neuen Nadel aufgezogen. Die Mischung erfolgt durch Kippen der Spritze.
- e) Abdecken der Nadel durch sterilen Plastikumschlag.
- f) Nach 1-stündiger Sedimentierung wird die Lösung in das Nährmedium injiziert. Damit die Lage der Spritze nicht verändert werden muß, wird die Nadel um 90° abgebogen. Das Sediment kann eventuell für Blutgruppenbestimmungen verwendet werden.

Bei unvollständiger Gerinnung wird eine neue Blutentnahme erforderlich. Es ist möglich, auf diese Weise gewonnene Zellen einem entsprechenden Institut zuzuschicken.

Die Anlage und Auswertung der Zellkulturen erfolgt nach den üblichen Grundsätzen.

6. Peripheres Blut - Lymphozyten (II)

LYCELTE et al. (34) vereinfachen die Methode nach EDWARDS (8), indem sie für jeden Patienten 4 Kulturflaschen vorbereiten. Die Kulturlösung besteht pro ml aus 5000 E Heparin, 250 000 E Penicillin und 250,000 μ g Streptomycin und 0,05 ml PHA. Jede Flasche wird mit 4 ml Blut aufgefüllt und tiefge-

kühlt (Eis) an das betreffende cytologische Labor versandt. Die Weiterbehandlung erfolgt nach üblicher Methodik.

7. Peripheres Blut - Leukozyten (III)

Eine weitere Vereinfachung der EDWARD'schen Idee, nämlich ambulant entnommene Blutzellen einem Laboratorium zuzuschicken, wurde von GROPP (17) beschrieben. Der Autor konnte nachweisen, daß PHA noch nach 3 - 4 Tagen auf die Leukozyten eine mitosefördernde Wirkung hat. Er verzichtet bei der Herstellung der Nährflüssigkeit auf das Phaseolin, welches erst bei weiterer Inkubation im Labor zugesetzt wird. Das Aufbereitungsverfahren entspricht im übrigen der Methode nach EDWARDS (8).

8. Peripheres Blut - Leukozyten (IV) Mikromethode

Für die Fälle, bei denen nur eine geringe Menge Blut zur Verfügung gestellt werden kann (Neugeborene!), entwickelte FRØLAND (16) folgende Mikromethode:

In einer heparinisierten Pippette werden 0,2 ml Blut aspiriert und anschließend in ein Reagenzglas übertragen, das 1 ml AB-Serum enthält. Nach vorsichtigem Mischen wird das Reagenzglas 15 - 45 min. in schrägem Winkel aufgestellt. Anschließend wird das überständige Serum zusammen mit 2 ml Medium 199 aufgezogen und wiederum vorsichtig durchmischt. In 3 Reagenzgläsern werden die so erhaltenen Kulturen mit Zusatz eines Tropfens PHA 3 Tage lang inkubiert. Die Inkubation wird für weitere 4 Stunden durchgeführt, nachdem man vorher einen Tropfen einer 0,04 %igen Lösung von Colcemid zugegeben hat. Nach Zentrifugieren Zugabe von 1 ml 0,95 %igem Natriumcitrat und Inkubation bei 37°C für 15 min. Aus jeder Kultur gewinnt man etwa 10 Präparate, die auf übliche Weise fixiert und gefärbt werden.

9. Peripheres Blut - Leukozyten (V) Mikromethode

Ein ähnliches Verfahren entwickelten KWEI-CHI-HO und SMITH (30), die nur ein einziges steriles Reagenzglas verwenden, das mit 2 ml Medium 199 beschickt wurde. 3 - 10 Tropfen Blut aus der Fingerbeere läßt man zulaufen. Nach Sedimentierung wird in üblicher Weise verfahren. Die Verwendung nur eines Behälters ermöglicht eine maximale Ausbeute; die Gefahr der bakteriellen Besiedelung wird auf ein Minimum reduziert.

10. Knochenmark (I)

Eine Zellkultur aus Knochenmark anzulegen, gelingt mit denselben Methoden wie sie für Leuko- und Lymphozyten durchgeführt werden. Dieses ist verständlich, da es sich genetisch um dasselbe Material handelt. Die Mitosefähigkeit der Knochenmarkszellen ist jedoch viel größer, was darin zum Ausdruck kommt, daß die Zellteilung bereits nach 2 Stunden einsetzt. Die höhere Mitoserate pro Zelleinheit gewährleistet eine so große Ausbeute, daß auf Zugabe von PHA verzichtet werden kann.

An Knochenmarkszellen beschrieben SCHIFFER et al. (51) eine Färbemethode mit Akridin-Orange. Die Präparate werden dabei unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Da nur die Chromosomen aufleuchten, wird die Verfälschung durch Fremdpartikel, die ja in durchfallendem Licht ebenfalls zur Abbildung kommen, vermieden.

11. Knochenmark (II)

Von JACKSON und BARR (24) wird die Radioautographie dazu benützt, Karyotypen von Knochenmarkszellkulturen darstellen

zu können. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß während der Zellteilung markiertes Tritium in das Thymidin des Nucleoproteidkomplexes der Chromosomen eingebaut wird. Die Strahlungsenergie des radioaktiven Tritiums bewirkt die Schwärzung der photoempfindlichen Schicht, mit der das Präparat bedeckt wird. Bei der photomechanischen Reproduktion werden die Stellen, an denen markiertes Tritium angereichert ist, stark kontrastiert abgebildet.

Die Technik, die von JACKSON und BARR (24) angegeben wird, wird folgendermaßen durchgeführt:

Menschliches Knochenmark wird in einer heparinisierten Spritze aspiriert. 5 ml Substanz werden in ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen eingebracht, das vorher mit einem nucleotid beschickt wurde, welches mit markiertem Tritium mit einer Strahlungsenergie von $5 \mu\text{c}$ versetzt wurde. Nach durchmischen wird die Lösung 8 min. lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 min. langem Zentrifugieren mit 500 U/min. wird der Überstand abpipettiert. Um die markierten Nucleotide, die im Plasma enthalten sind, zu entfernen, wird nochmals für 3 - 4 min. zentrifugiert. Die Zellmasse wird auf 3 ml mit patienteneigenem Plasma aufgefüllt und in ein steriles Kulturgefäß eingebracht, das 5 ml Medium 199 und eine 100-fache Menge unmarkiertes Nucleotid enthält. Nach sterilem Verschuß der Flasche wird bei $37,5^{\circ}\text{C}$ in einem Schüttelinkubator (Dubnoff) bei einer Luftzusammensetzung von 5 % CO_2 , 13 % O_2 und 82 % N_2 inkubiert. Diese Kulturbedingungen fördern die Zellteilung und das physiologische Wachstum der Knochenmarkszellen. Nach einer entsprechenden Wachstumsperiode wird Colchicin in einer Konzentration von 10^{-8} zugesetzt. Nach 30 min. wird die Kultur mit einer physiologischen NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend werden 5 ccm einer hypotonischen Lösung, bestehend aus Kälberserum und Aqua dest. (1 : 5) zugesetzt. Nach Fixierung mit Methanol, Essigsäure (3 : 1)

werden die Präparate an der Luft getrocknet. Die Überlegenheit dieser Methode hat sich besonders erwiesen am Knochenmark leukämischer Patienten, weil die entarteten Zellen oft schlecht auf die umständliche Behandlung während des Markierungsprozesses reagieren. Zusätzlich wird die künstliche Kulturperiode auf ein absolutes Minimum beschränkt, wodurch physiologische Bedingungen zum Einbau markierter Nucleotide geschaffen werden.

11. Knochenmark (III)

Die autoradiographische Chromosomendarstellung stößt bei der photographischen Reproduktion deswegen auf Schwierigkeiten, weil die Korngröße des Silberbromids der verwendeten strahlenempfindlichen Schicht in einem Bereich liegt, der die Abbildung einzelner Chromosomen empfindlich stört. ROSS (49) beschrieb eine Methode, mit deren Hilfe es gelingt, nach Radioautographie des Silberbromid der Photoschicht aus dem Präparat herauszulösen und den Karyotyp anschließend einer einwandfreien Beobachtung zugänglich zu machen. Der technische Vorgang dieser Methode wurde von ROSS (49) folgendermaßen beschrieben:

Das Deckgläschen, welches die Zellkultur trägt, wird mit Xylol vom Objektträger abgelöst und für 15 min. mit einem 7,5 %igen Kaliumferricyanidbad behandelt. Anschließend wird dreimal mit 24 %igem Natriumtriosulfat gewaschen, wobei das Deckgläschen bei der dritten Waschung für 5 min. in der Lösung verbleibt. Endlich wird das Deckglas 5 min. mit fließendem Leitungswasser abgespült, luftgetrocknet und auf einem neuen Objektträger mit Perubalsam fixiert. ROSS (49) berichtete von sehr guten Erfolgen dieser Methode, da es in seinen Versuchsserien bei dieser Behandlung zu keinen artifiziellen Chromosomenzerstörungen gekommen ist.

III. Eigene Untersuchungen ^{*)}

a) Methodik

Im folgenden wird über 25 Patienten berichtet, bei denen je 3 Blutkulturen angelegt wurden. Um technische Modifikationen zu ermöglichen, wurde von 2 Patienten aus Knochenmark je eine Gewebekultur gezüchtet. Pro Blütentnahme wurden jeweils 2 - 4 Nährmedien beimpft. Grundlage der Versuchsanordnung war die klassische Methode nach MOORHEAD et al. (37).

(I)

20 ml durch Venenpunktion gewonnenes Blut werden sofort zu gleichen Teilen in zwei 15 ml große Zentrifugengläschen unter Zusatz von 0,25 ml Heparin eingebracht. Die Innenfläche sämtlicher Glasbehälter wurde mit einem Silikonfilm überzogen und anschließend sterilisiert. Nach Durchmischen mit einer größeren Pipette wird jedem Glas 0,3 ml Difco PHA-M zugesetzt, welches jeweils frisch aufbereitet werden muß. Die Unbrauchbarkeit mehrerer Kulturen beruhte auf der Tatsache, daß zu Beginn der Versuche kein frisches PHA verwendet worden ist. Eine Lösung von PHA-M besitzt nur kurzfristig maximal mitosefördernde Wirkung.

(II)

Man läßt das PHA-M 30 min. lang bei einer Temperatur von + 3°C einwirken. Anschließend wird bei einer Drehzahl von 350/min. 5 min. lang zentrifugiert. Bei Erhöhung der Drehzahl über 350 U/min. besteht die Gefahr, daß der Plasmaüber-

^{*)} Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Hilfe der Friedrich Baur Stiftung durchgeführt.

stand keine Zellen mehr enthält, da die Leukozyten zusammen mit den Erythrozyten vollständig sedimentieren.

(III)

Das Plasma wird erythrozytenfrei abpipettiert und steril aufgefangen. Anschließend werden in Erlenmeyerkolben die Kulturen angesetzt. Zur Verhütung bakterieller Verunreinigungen werden die Kulturen mit einer 0,2 ml Mischung aus Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (Ciba) versetzt und die Kulturgläser mit geschliffenen Stöpseln verschlossen. 3 ml zentrifugiertes Plasma werden zusammen mit 7 ml Medium 199 je Erlenmeyerkolben unter oben beschriebenen antibiotischen Schutz angesetzt. Die hellrote Farbe der Kulturflüssigkeit entspricht einem pH-Wert von 7,4, der normalerweise bei exakt beachteter Vorschrift erreicht wird. Tritt trotzdem ein Farbumschlag nach gelb ein, ist die optimale Inkubationsdauer 48 Stunden an Stelle von 72 Stunden.

(IV)

Es wird eine Colcemidlösung von 2 μ /ml hergestellt, von der 0,03 ml/ml Kulturflüssigkeit injiziert wird. Nach Zusatz des Colcemids wird für weitere 2 1/2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur gleichmäßigen Verteilung des Colcemids und um die Zellen möglichst wenig zu schädigen, wird die Kulturlösung in einer sterilen Pipette mit kleiner Öffnung wiederholt aspiriert. In der Folge wird 5 min. bei 800 U/min. zentrifugiert und der zellfreie Überstand entfernt. Das zelluläre Sediment wird bei Raumtemperatur mit 5 ml Hank's Lösung gemischt. Es wird wieder mit einer Pipette durchmischt, wobei die Lösung langsam aspiriert wird. 2 min. erschienen uns ausreichend für gleichmäßige Verteilung. Nach weiterem 5 min. langen Zentrifugieren (800 U/min.) wird der Überstand abgezogen. Die

notwendige Hypotonie wird durch Zusatz von 1 1/2 ml Aqua dest. erreicht, das 10 min. auf die Zellen bei 37°C im Inkubator wirkt. Bei längerer Wassereinwirkung kam es in vielen Fällen zur Zerstörung der Zellmembran, wodurch die Chromosomenzugehörigkeit zum einzelnen Zellkern bei mikroskopischer Betrachtung nicht mehr eindeutig bestimmt werden konnte.

Das Wasser und die Zellen werden durch Zentrifugieren mit hoher Drehzahl (1500 U/min.) getrennt und anschließend fixiert. Am besten eignete sich Methanol-Eisessig (3 : 1), das schon von MOORHEAD (37) angegeben wurde. Die Fixierungszeit beträgt 10 min. bei 37°C. Die Trennung von Zellen und Fixierflüssigkeit geschieht mit der Zentrifuge (5 min., 600 U/min.). Mit einer Mikropipette werden die Zellen auf einen Objektträger gebracht. Erwies sich bei einer Kontrollbetrachtung, daß die Zellen zu dicht gelagert waren, wurde der Zellrückstand mit der Fixierflüssigkeit entsprechend angereichert.

Es ergab sich, daß der Vorbereitung der Objektträger eine entscheidende Bedeutung zukommt. Vorbedingung für gleichmäßige Verteilung der Zellen ist maximale Sauberkeit der Objektträger. Sie waren in brauchbarem Zustand nach 12-stündiger Einlagerung in Dichromatschwefelsäure und anschließendem Wässern in Aqua dest. Es wurde eine bessere Ausbreitung durch Unterkühlen der Objektträger erreicht. Dazu war es erforderlich, die gereinigten Objektträger für längere Zeit bis unmittelbar vor Benützung im Eisschrank zu halten.

Bei mäßiger Hitze wurden die Präparate über dem Bunsenbrenner luftgetrocknet.

Zur Färbung wurde Orcein (GURH) verwendet. Die Präparate anderer Firmen lieferten weit weniger gute Resultate. 1 g Orcein wird mit 45 ml kochendem Eisessig gelöst. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur auffüllen der Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml.

Die fertige Farblösung wird unter Druck durch einen feinen Membranfilter gepreßt und ist 2 Wochen haltbar, wenn sie vor jedem Gebrauch erneut gefiltert wird.

Die Präparate müssen im Durchschnitt 8 - 10 min. gefärbt werden. Bei älteren Farblösungen wird die Färbezeit unter Umständen bis auf 15 min. erhöht. Nach Entwässern der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe werden sie mit Perubalsam eingedeckt.

Zur Auswertung der Präparate wurde ein Mikroskop vom Typ Panphot (Leitz) mit der Mikroaufsatzkamera Orthomat (ebenefalls Leitz) verwendet. Brauchbare Zellen waren schon bei einer 10-fachen Lupenvergrößerung zu finden. Die Auswertung der Chromosomensätze erfolgte mit 80-facher Objektivvergrößerung und einem 20-fachen Okular. Ein Immersionsöl mit Brechungsindex 1,515 erbrachte optimale Resultate.

Die Chromosomenzählung wurde auf 3 verschiedene Arten durchgeführt:

a) Durch Anfertigen einer Skizze.

Unter direkter Mikroskopbetrachtung wurden die Mitosen nachgezeichnet und die Chromosomen anschließend gezählt.

b) Mit Hilfe eines Zählnetzes.

Auszählen der Chromosomen in den einzelnen Quadraten.

c) Photographische Reproduktion.

Zur Dokumentation wurden von allen brauchbaren Metaphasestadien photographische Aufnahmen angefertigt, mit deren Hilfe die direkten Beobachtungen kontrolliert werden konnten. Bei Versuchen mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden gegenüber der Methode im durchfallenden Licht keine besonderen Erfolge erzielt.

Die zur Auswertung brauchbaren Mitosen sind nur in seltenen Fällen zu finden, wenn man eine vollständige Darstellung sämtlicher Chromosomenpaare benötigt. Die Unmöglichkeit der deutlichen Reproduktion eines vollständigen Chromosomensatzes beruht auf der Tatsache, daß das Kernmaterial dreidimensional gelagert ist. Um trotzdem vollständige Chromosomenpaare zu erhalten, wurden von einer Mitose mehrere Aufnahmen bei verschiedenem Fokus angefertigt, die anschließend miteinander verglichen wurden.

Für alle photographischen Aufnahmen wurde der AGEPE-Film der Firma AGFA benützt. Das Licht wurde gelb-grün gefiltert, was den Kontrast bedeutend erhöhte. Die Filme wurden leicht unterblichtet (durch Einstellung einer höheren Filmempfindlichkeit am Orthostat). Eine weitere Kontrasterhöhung wurde durch Überentwicklung und Kopieren auf extrahartem Papier erreicht.

Die Chromosomenbilder werden einzeln ausgeschnitten und nach der Denver Methode (27) auf einem Formblatt geordnet. Bei Überschneidung einzelner Chromosomenpaare kam es sehr zustatten, daß Aufnahmen in verschiedenen optischen Ebenen angefertigt wurden. Um zu vermeiden, verschiedene Chromosomen doppelt auszuwerten, zeichnete man den Umriß vergrößerungsgetreu auf ein Papier und ordnete die ausgeschnittenen Chromosomenbilder in gleicher Weise wie im Präparat darin an. Anschließend wurde mit einer Kontrollkopie verglichen.

Wir verzichteten auf die Verwendung des Camera lucida-Verfahrens, da die mechanische Reproduktion eventuell Fehlerquellen eindeutiger ausschließt.

Als Nachtrag zum Abschnitt Technik möchten wir vermerken, daß es uns nicht gelang, mit der Methode nach JUNGKLAAS (28)

annähernd so gute Ergebnisse zu erreichen wie mit der modifizierten Methode nach MOORHEAD (37). Die auftretenden Schwierigkeiten bestanden vor allen Dingen darin, daß während der Phase der physiologischen Sedimentation die Kanülen der verwendeten Spritzen verklebten, so daß es oft nicht gelang, die überstehende Zellflüssigkeit in das Nährmedium zu injizieren. Die ebenfalls von JUNGKLAAS (28) beschriebene Methode des "squash" haben wir auch verworfen, da der unterschiedliche Fingerdruck häufig ein Zerplatzen der ohnedies empfindlichen Zellen bewirkte. Es wurde dadurch unmöglich, die Chromosomenpaare einander exakt zuzuordnen.

III. b) Bisherige Ergebnisse

Von 25 untersuchten Patienten werden von 15 die Ergebnisse besprochen. Bei den Patienten handelte es sich um 7 männliche und 8 weibliche; die Altersgruppen sind weit gestreut, da in den Fällen, wo es uns aus genetischen Interessen wichtig erschien, die Eltern mit untersucht wurden.

Es werden zwei Fälle von klinisch diagnostizierter trisomaler Idiotie und ein weiterer Fall, bei dem die klinische Untersuchung nicht zur eindeutigen Diagnose Mongolismus geführt hat, beschrieben. Da an dieser Patientin keine typische Trisomie festgestellt werden konnte, wurde auch von den Eltern eine Chromosomenanalyse durchgeführt.

Gertrud S.

Geb. am 16.6.1961 als fünftes Kind am Termin. Die Mutter war 37 Jahre alt. Das Geburtsgewicht betrug 3000 g. Am 3. Lebenstag kam es wegen Trinkschwäche für 10 Tage ins Krankenhaus.

Noch nach 2 Jahren (20.8.1963) bestand hochgradige Trinkschwäche. Das Kind nahm nichts festes zu sich und war stark untergewichtig.

Bisherige Entwicklung: Zahndurchbruch erfolgte erst mit 20 Monaten; Stehen ohne Stütze ab 22 Monaten. Das Kind spricht bisher nicht. Im Alter von 1/2 Jahr erlitt es eine Lungenentzündung; anschließend häufig Erkältungen.

Jetziger Einweisungsgrund: Das Kind trinkt nur Flasche, hat Schluckbeschwerden und schnarcht nachts laut und gequält.

Befund: Es handelt sich um ein kleines, stark untergewichtiges Mädchen mit allen Zeichen trisomaler Idiotie. Die Herztöne sind leise, aber rein zu hören, das untere Sternum ist deutlich vorgewölbt, die Leber einen Querfinger unter dem Rippenbogen verbreitert. Die Tonsillen sind groß und zerklüftet. Das Blutbild zeigt eine hypochrome Anämie von 11,1 g % Hb. Das EEG zeigt eine unzureichende Grundtätigkeit bei mangelhafter Koordination beider Hemisphären. Eine Röntgenaufnahme der linken Handwurzel zeigt einen Ossifikationsrückstand. Eine Thoraxübersichtaufnahme zeigt das Herz nach links verlagert und das Colon ascendens und Colon transversum im rechten Thoraxraum.

In der Folge wird die rechtsseitige Zwerchfellhernie operativ beseitigt und das Colon in den Bauchraum rückverlagert. Bei einer zweiten klinischen Aufnahme am 27.9.1963 ergibt sich ein fast unveränderter Befund. Eine erneute Thoraxaufnahme zeigt nun eine Pleuraverschiebung rechts. Das Chromatingeschlecht wird aus Zellen der Wangenschleimhaut bestimmt. In 22 % der untersuchten Zellen finden sich Chromatinkörperchen. Das Geschlecht ist also eindeutig weiblich.

Chromosomenuntersuchung: 50 % der gezählten Zellen ergaben einen Chromosomensatz von 47. Die Idiogramme (Abb. 1) ergaben

eine Trisomie wahrscheinlich bei Nr. 21. Diagnose: Trisomaler Schwachsinn.

Gertrud S., 3 Jahre alt

Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
45	45	46	47	48		
8		10	25	7	X	X

Monika E.

Geboren am 13.10.1961 termingerecht als drittes Kind eines 40-jährigen Vaters und einer 37-jährigen Mutter. Zwei gesunde Schwestern von damals 18 und 12 Jahren leben. Am 2. Lebens- tag kam das Kind wegen Trinkschwäche für 3 Monate zur kli- nischen Behandlung. Die weitere Entwicklung verlief schlecht wegen bestehender Trinkschwäche.

Be_fund: Es handelt sich um ein unruhiges Kind mit typischen Zeichen trisomaler Idiotie: Brachycephalie, breite Nasen- wurzel, Epikanthus, herausgestreckter Zunge, Vierfingerfurche, Muskelhypotonie, schnorchelnde Atmung, Speichelfluß und Rectusdiathese. Die Röntgendiagnose der Handwurzel erbrachte einen erheblichen Rückstand der Knochenkernentwicklung im Ver- hältnis zum Alter der Patientin. Weiter zeigte sich eine deutliche Verbreiterung der präparatorischen Verkalkungszone im Bereich der distalen Unterarmmetaphysen. Das Genitale war unauffällig.

Chromosomenuntersuchung: Bei 50 % der gezählten Zellen ergab sich ein Chromosomensatz von 47. Die angefertigten Idiogramme

zeigten eine Trisomie wahrscheinlich bei 21.
Diagnose: Trisomaler Schwachsinn.

Monika E., 3 Jahre alt

Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
45	45	46	47	48		
15		10	25		X	X

Gertraud P.

Geboren am 20.8.1960 als drittes Kind eines 49-jährigen Vaters und einer 33-jährigen Mutter. Die ersten Zähne kamen mit 6 Monaten. Die weitere Entwicklung blieb zurück, so daß das Kind nach 2 Jahren zur klinischen Untersuchung am 10.9.1962 vorgestellt wurde.

Befund: Es handelt sich um ein Kind mit typischen aber unvollständigen Zeichen eines trisomalen Schwachsinn: die geistige Entwicklung war zurückgeblieben; das Kind spricht nicht und nimmt nur schwer Kontakt auf. Die Kopfform ist brachycephal mit Sattelnase und etwas offenstehendem Mund. Die Cutis ist marmoriert, die Muskulatur hypoton bei hochgradigem statischen Entwicklungsrückstand. Eine Vierfingerfurche fehlt und ein Spikanthus ist nicht deutlich ausgeprägt. Die Röntgenuntersuchung der Handwurzel erbrachte eine Knochenkernzahl, die einer 5- bis 6-jährigen entspricht. Die Kerne waren jedoch deutlich kleiner. Wegen der Debität des Kindes konnten bei den Hörprüfungen keine eindeutigen Befunde erhoben werden. Der ohrenärztliche Spiegelbefund war normal. Das EEG war nicht verändert.

Trotz Fehlen wichtiger Kardinalsymptome wurde als Genese

des vorliegenden Krankheitsbildes ein trisomaler Schwachsinn angenommen.

Chromosomenanalyse: Bei 66 2/3 % der gezählten Zellen ergab sich ein Chromosomensatz von 46. Die angefertigten Idiogramme (Abb. 2) zeigten ein normales Chromosomenbild.

Gertraud P., 2 Jahre alt

Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
45	45	46	47	48		
2	2	18	4	1	X	X

Die Chromosomenuntersuchung der Eltern ergab bei der Mutter in 52 % und bei dem Vater in 56 % der gezählten Zellen einen normalen Chromosomensatz von 46.

Eltern P.

	Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
	45	45	46	47	48		
Trude P. 33 Jahre	6		13	3	3	X	X
Johann P. 49 Jahre	3	5	14	2	1	X	Y

Eine weitere Untersuchung betraf ein Geschwisterpaar vogelköpfiger Zwerge und einen Grenzfall dieser Zwergwuchsform. (MAITINSKY, 35).

Klaus R., 5 Jahre alt; Wolf R., 4 Jahre; Maria D., 6 Jahre.

Bei unseren Beobachtungen handelte es sich einmal um ein Brüderpaar, das erstmals am 25.12.1962 im Alter von 5 und 4 Jahren zur Beobachtung kam. Der ältere der Brüder, Klaus R., wog bei der Geburt 1260 g und war 36 cm lang, bei der ersten Untersuchung hier war das Gewicht 4600 g, die Größe 67 cm. Es wurde ein Therapieversuch mit anabolem Hormon gemacht, der aber wegen der Virilisierungserscheinungen abgetroffen werden mußte. Bei der letzten Beobachtung hier am 1.10.1963 wog Klaus 6700 g und war insgesamt um 7,2 cm auf 74,2 cm gewachsen.

Der jüngere Bruder, Wolf R., wog bei der Geburt 2250 g und war 43 cm lang. Am 25.6.1962 betrug sein Gewicht 8300 g, seine Körperlänge 74 cm. Der Therapieversuch mit anabolem Hormon mußte aus den gleichen Gründen wie bei seinem Bruder aufgegeben werden. Bei der letzten Beobachtung am 1.10.1963 wog Wolf 10100 g und war insgesamt um 8,2 cm auf 82,2 cm gewachsen.

Das dritte Kind, Maria D., kam am 28.3.1963 im Alter von 6 Jahren zur Beobachtung. Sie wog bei der Geburt angeblich 3250 g, die Länge war 43 cm. Bei der Untersuchung hier betrug das Gewicht 14,1 kg, die Länge 96 cm. Es wurde eine Therapie mit anabolem Hormon vorgeschlagen, leider kam das Mädchen jedoch nicht wieder in unsere Behandlung, so daß zur Zeit über den weiteren Verlauf nichts berichtet werden kann.

Die Chromosomenuntersuchung ergab bei allen drei Fällen keine chromosomale Aberration.

	Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
	45	45	46	47	48	49	
Wolfgang R. 6 Jahre	5	3	13	1		1	X Y
Klaus R. 7 Jahre	13	4	16	4	2		X Y
Maria D. 6 Jahre	7	1	20		2		X X

Anschließend wird ein Fall eines Cerebralschadens beschrieben, der mit einer Hypothyreose und fehlendem Descensus der Testikel einhergeht.

Ernst S., 7 Jahre alt

Geb. am 13.9.1956 als erstes Kind gesunder Eltern, kam am 5.6.1963 im Alter von 6 Jahren zur stationären Aufnahme. Die Geburt erfolgte am Termin nach 3-stündiger Wehendauer, das Geburtsgewicht betrug etwa 3000 g. Als Säugling war er hochgradig trinkschwach, die statische Entwicklung war sehr verzögert, im Alter von 6 Monaten konnte er den Kopf noch nicht heben, mit 12 Monaten lernte er sitzen, mit 18 Monaten laufen. Vom 6. Lebensmonat an gedieh der Bub gut, es entwickelte sich eine Adipositas, gleichzeitig machte sich ein mäßiger Wachstumsrückstand und eine Oligophrenie bemerkbar.

Der Grund zur stationären Einweisung war die geistige Retardierung, das Übergewicht und der beidseitige Kryptorchismus. Bei der klinischen Untersuchung fielen die relativ zierlichen Hände und Füße des Buben auf.

Die Symptome sind dem von FRADER, LABHART, WILLI und FANCONI, 1956 beschriebenen Syndrom zuzuordnen. Eine ausführliche Veröffentlichung der Befunde ist an anderer Stelle in Vorbereitung. (MURKEN, VOGT et al)

Die Chromosomenuntersuchung dieses Falles ergab in 58 % der ausgezählten Zellen einen normalen Chromosomensatz von 46.

Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
45	45	46	47	48		
5	10	29		6	X	Y

Eine weitere von uns untersuchte Patientin hatte ein Turner Syndrom.

Hannelore D., 23 Jahre alt,

geb. am 16.11.1940, kam 1955 zum ersten Mal in stationäre Behandlung. Das Kind wurde termingerecht geboren, das Geburtsgewicht betrug 3850 g. Es hatte eine schwächliche, aber normale Entwicklung. Die ersten Zähne kamen im 5. Monat. Die geistige Entwicklung war normal. 1948 wurde sie wegen Minderwuchs untersucht, dabei wurde ein normales Knochenalter festgestellt. Sie hatte damals die Größe einer 6-jährigen und das Gewicht einer 5-jährigen. Im Alter von 12 1/2 Jahren zeigte sich eine deutlich zunehmende Adipositas. Trotz Behandlung mit Inkretan erfolgte eine weitere Gewichtszunahme. In den Pseudomammæ war kein Brustdrüsengewebe tastbar. Die Pubes bildeten sich gering aus und die Axillarbehaarung fehlte. Eine Menstruation ist nie eingetreten. Eine Ovulationstherapie mit Zusatz von Notandran im Jahre 1955 über 4 Monate bewirkte eine Längenzunahme von 6 cm. Im Jahre 1961 heiratete sie. 1964 stellte sie sich in der Klinik wegen abnormer Knochenbrüchigkeit und wiederholten tetanischen Anfällen erneut vor. Die Untersuchung von Blut- und Wangenschleimhautabstrichen ergab das Fehlen von Chromatinkörperchen. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurden bei der Chromosomenanalyse aus einer Leukozytenkultur nur 45 statt 46 Chromosomen und ein X-Chromosom im Karyotyp festgestellt.

Chromosomenzahl der gezählten Zellen					Geschlechts- chromosomen	
45	45	46	47	48		
20	30				X	O

Bei den restlichen Fällen handelt es sich um: Lipoidnephrose, Hypopituitarismus, Thalassaemia major, Morbus Hodgkin und einen Cerebralschaden ungeklärter Genese mit Hypospadie und Amaurose.

Da bei manchen dieser Krankheitsbilder unter Umständen eine familiäre Disposition vorhanden ist (z.B. Lipodnephrose FANCONI, 9), es sich andererseits bei der Thalassaemie um ein dominant vererbtes Leiden handelt und bei Morbus Hodgkin die Ätiologie ungeklärt ist, glaubten wir, daß die Untersuchung der Chromosomen einen Beitrag zur Beschreibung derartiger Syndrome leisten könne. Im Folgenden machen wir eine Aufstellung der zahlenmäßigen Ergebnisse der ausgewerteten Zellen dieser Patienten. Die Diagramme der Chromosomenverteilung sowie je ein Karyotyp eines nicht geklärten und einer gesicherten trisomalen Idiotie sowie eines Falles von Turner Syndrom zeigen wir in Teil VI (Bildteil).

	Diagnose	Chromosomenzahl d. gezählten Zellen					Geschlechtschromosomen	
		<45	45	46	47	48		
Herbert R. ♂ 10 Jahre	Nephrose	7	10	25		8	X	Y
Friederike R. ♀ 17 Jahre	Hypopituitarismus	1	4	40		5	X	X
Felicia R. ♀ 9 Jahre	Thalassämia major	10		28	5	7	X	X
Michael B. ♂ 9 Jahre	M.Hodgkin	2	5	38		5	X	Y
Karl K. ♂ 2 Jahre	Cerebralschaden	5	3	13		4	X	Y

IV. Diskussion

Die Befunde an Patienten mit solchen Krankheitsbildern, von denen in der Literatur bereits Chromosomenanalysen beschrieben worden sind, decken sich im wesentlichen mit den Angaben anderer Autoren. Bei den Krankheiten ungeklärter Ätiologie, bei denen die chromosomale Struktur nicht ohne weiteres mit den klinischen Symptomen in einen Kausalzusammenhang gebracht werden kann, fanden wir bei unseren Untersuchungen keine Abweichungen des normalen Karyotyps.

An beiden Fällen von trisomaler Idiotie ergaben sich bei 50% der ausgewerteten Zellen 47 Chromosomen. Diese von der Norm abweichende Chromosomenzahl wurde erstmals 1959 von LEJEUNE et al. (31, 32) beschrieben. Nachdem später von anderen Autoren (2, 45, 56) LEJEUNE's Befunde bestätigt werden konnten, wurde die Methode der Chromosomenanalyse von vielen Kliniken zur Diagnose des Mongolismus verwendet.

In den Fällen wo die Symptomatik dieses Syndroms nicht vollständig ausgeprägt ist, ist nicht immer eine Chromosomenzahl von 47 zu finden. Solche Fälle wurden von WARKANY et al. (56) 1964 beschrieben.

Bei der von uns beschriebenen Patientin, deren Krankheitsbild insofern unvollständig war, als sie weder einen Epicanthus, noch eine Vierfingerfurche hat, fand sich ein normaler Chromosomensatz von 46. Bei der Untersuchung des elterlichen Karyotyps zeigte sich ebenfalls keine Abweichung von der Norm. PENROSE (45) und BENDA (2) konnten zwar bei klinisch gesunden Verwandten mongoloider Kinder eine breite Streuung solcher Zellen finden, die eine Chromosomenzahl von 47 aufwiesen, doch hatten ja die Patienten selbst eine nachgewiesene chromosomale Aberration. Trotz der gehäuften chromosomalen Aberration dieser Patienten kam durch die Untersuchung der Eltern eine familiäre Disposition ausgeschlossen

werden. Bei dem von uns untersuchten oligosymptomatischen Kind war bei den Eltern kein atypischer Chromosomensatz zu erwarten.

Daß eine Chromosomenzahl von 47 nicht pathognomonisch für die Trisomie angesehen werden kann, wurde bereits 1960 von POLANI et al. (47) gezeigt, die ein klinisch einwandfrei mongoloides Mädchen mit normalem Chromosomensatz beschrieben haben. Damit wird gleichzeitig der Begriff der Trisomie und trisomalen Idiotie als Synonym für die mongoloide Idiotie in Frage gestellt.

Die Chromosomenuntersuchung an drei vogelköpfigen Zwergen wurde von uns im Zusammenhang mit S. MAITINSKY (35) durchgeführt. Wir hielten die Erforschung der chromosomalen Struktur dieser extrem seltenen Form des Zwergwuchses deshalb für bedeutungsvoll, weil bisher nur ein einziger Fall von DE LA CRUZ (6) 1963 beschrieben wurde. Weder war es möglich, bei dem Geschwisterpaar vogelköpfiger Zwerge, noch bei dem fraglichen Fall eines Mädchens eine chromosomale Abnormalität in Bezug auf Zahl und Größe zu finden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Befund von DE LA CRUZ (6)

Bei dem von uns untersuchten Fall einer Frau mit Turner Syndrom fanden wir überwiegend einen Chromosomensatz von 44 Autosomen und einem X-Chromosom. Diese Zahl entspricht vollständig den Befunden von POLANI (46), FORD et al. (14, 15) und WARKANY et al. (56).

Die quantitative Abweichung der Chromosomenzahl vom normalen Wert bzw. von einer für das jeweilige Krankheitsbild typischen Zahl haben wir in Tabellen dargestellt, in denen die Verteilung bezogen auf die Zahl der jeweils untersuchten Zellen zum Ausdruck kommt. Die unterschiedliche Verteilung ist so uncharakteristisch, daß sie keine Schlüsse in Bezug auf Ausprägung des Krankheitsbildes zuläßt.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über Methoden zur mikroskopischen Darstellung von Chromosomen berichtet. Vorteile und Nachteile werden für bestimmte Forschungsvorhaben aufgezeigt. Es wird eine Modifikation der von MOORHEAD (37) angegebenen Methode beschrieben, deren Anwendbarkeit im zweiten Teil der Arbeit an Hand von 15 Fällen demonstriert wird. Bei den Patienten handelt es sich um je 3 Fälle von Mongolismus und vogelköpfigen Zwergen, ein Fall von dem von PRADER, LABHART, WILLI und FANCONI beschriebenen Syndrom und je ein Fall von cerebraler Schädigung unbekannter Ätiologie, Lipoidnephrose, Thalassaemia major, M. Hodgkin, Hypopituitarismus und Turner Syndrom.

Die Karyotypen der Mongoloiden ergaben eine 47iger Konstellation. An einem Fall mit unvollständiger Symptomatik ein normales Chromosomebild. Die Untersuchung der Eltern dieser Patientin erbrachte ebenfalls keine Abweichung von der Norm. An einem Fall von Turner Syndrom erhielten wir in typischer Weise 44 Autosomen und ein X-Chromosom. Bei allen anderen untersuchten Patienten war im Durchschnitt der gezählten Zellen ein völlig normaler Chromosomensatz zu finden.

Abb. 1 Gertrud. S., Trisomaler Schwachsinn

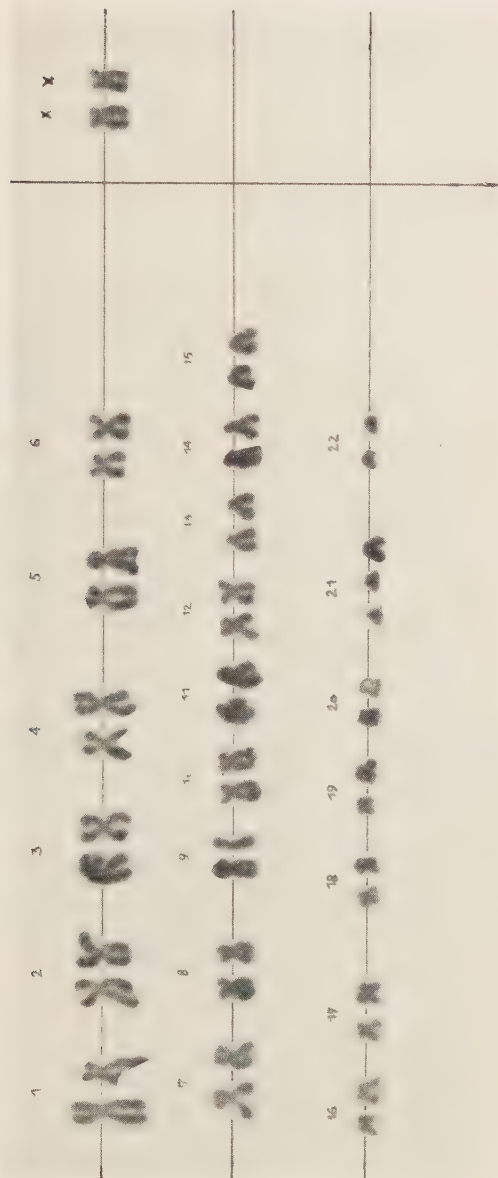
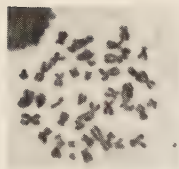


Abb. 2.

Gertraud P. Klinisch nicht gesicherter Mongoloider
Schwachsinn mit normalem Chromosomensatz.

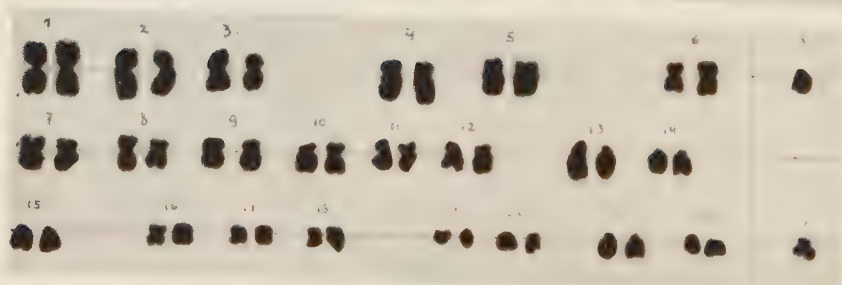
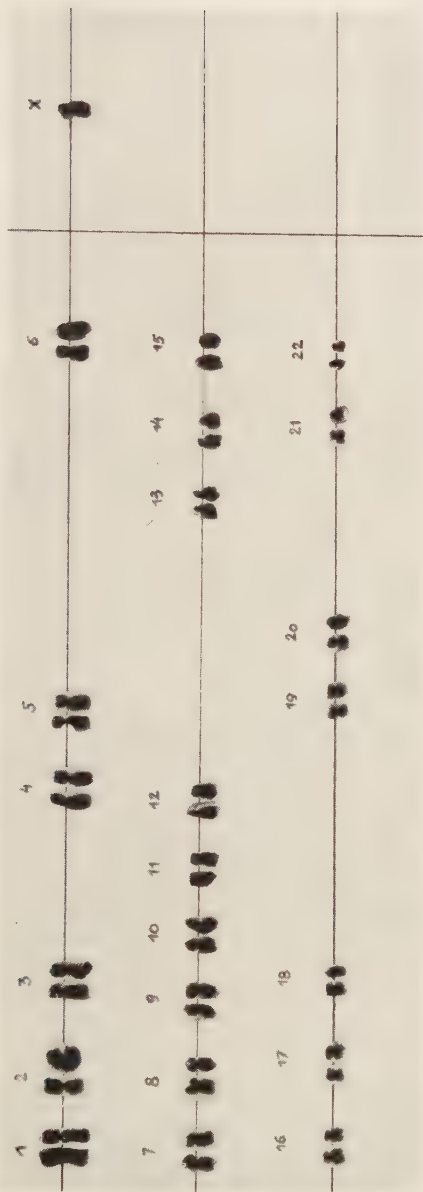
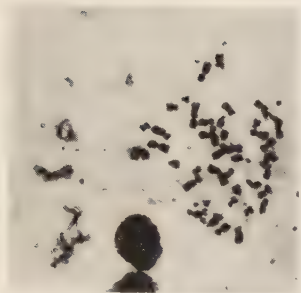


Abb. 3.
Hannelore D. Turner Syndrom



LITERATURVERZEICHNIS

1. AMALA CHAUDHURI Simplified Method for obtaining Leucocytes
for culture from peripheral blood.
The Human Chromosome Newsletter, 11:18 (1963)
2. BENDA, C. Chromosomal Research in Relation to various
Neuropathological Conditions, with Special
Reference to Mongolism.
IV Int. Congress of Neuropathology,
Proceedings Vol. III, Thema IV (1961)
3. BRIDGES, C.B Nondisjunction as a proof of the Chromosome
Theory of Heredity.
Genetics, 1:107 (1916)
4. BRYANT, E. et al. J. Nat. Cancer Inst.
14, 189 (1953)
5. CHU, E.A. und GILES, N.H.
Human Chromosome Complements in Normal
Somatic Cells in Culture.
Am. J. Human Genetics, 11:63 (1959)
6. DE LA CRUZ, F.F. Bird-headed Dwarf
Amer. J. Mental Deff.
68:54 (1963)
7. DUESBERG, H. Anat. Anz.
28 (1905)
8. EDWARDS, J.H. Chromosomal investigation by Post
Lancet 3:725 (1963)
9. FANCONI, G. und WALGREN, A.
Lehrbuch der Pädiatrie, S. 699
Benno Schwabe & Co., 5. Aufl.
Basel-Stuttgart (1958)
10. FERGUSON, M.A., und HANDMAKER, S.D.
Observations on the satellited human
chromosomes
Lancet 1:638-640 (1961)
11. FERGUSON, M.A. und HANDMAKER, S.D.
Observations on the satellited human
chromosomes
Lancet 2:1362 (1961)
12. FLEMMING, W. Arch. mikr. Anat. 20 (1882)
Anat. Anz. (1898)
13. FORD, C.E., und HAMERTON, J.H.
A colchicine, hypotonic citrate, squash
sequence for mammalian chromosomes
Stain Techn. 31:247 (1956)

14. FORD, C.E. et al.
Ibid. 183:1030 (1959)
15. FORD, C.E., JONES, et al.
Lancet i. 711 (1959)
16. FRØLAND, A. A micromethod for chromosomal analysis on
peripheral blood cultures
Lancet 12:1282 (1962)
17. GROPP, A. Leucocyte cultures for chromosome analysis
of material to be sent by mail or train
The Human Chromosome Newsletter
9:26 (1963)
18. GUYER, M.F. Biol. Bull. 19 (19107)
19. HALL, B. Lancet, ii:1026 (1962)
20. HANKS, J.H. und WALLACE, R.E.
Proc. soc. exp. Biol. N.Y.
71:196 (1949)
21. HANSELMANN, J. Virchows Arch. path. Anat.
123:356 (1891)
22. HARNDEN, D.G. A human skin culture technique used for
cytological examinations
British J. Exper. Pathol.
41:31-37 (1960)
23. HIRSCHHORN, K. und COOPER, H.L.
Chromosomal aberrations in human disease,
a review of the status of cytogenetics
in medicine.
Am. J. M. 31:442-470 (1961)
24. JACKSON, L.G. und BARR, M.A.
Modified technique of culture of human
bone marrow for radioautography of
chromosomes.
The Human Chromosome Newsletter 9:27 (1963)
25. JACOBS, P.A., und LAJTHA, L.G.
Nature 181:1565 (1958)
26. JACOBS, P.A., und STRONG, J.A.
Nature 183:302 (1959)
27. J. A. M. A. A proposed standard system of nomenclature
of human mitotic chromosomes
Vol. 174:159 (1960)
28. JUNGKLAAS, F.K.
Chromosomenstudien an menschlichen Blutzellen
Dtsch. med. Wschr.
88, 23, 1200 (1963)

29. KOSENOW, W. Neue Ergebnisse der Chromosomenforschung und ihre Bedeutung für die klinische Pathologie.
Archiv f. Kinderheilkunde, 162-219 (1960)
30. KWEI-CHI HO, und SMITH, J.B.
Further simplification of the whole blood microtechnique for leucocyte culture.
The Human Chromosome Newsletter
11:20 (1963)
31. LEJEUNE, M, et al.
Etudes des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens
C. rendus des séances de l'Académie des Sciences. t. 248 S. 1721-1722 (1959)
32. LEJEUNE, J., TURPIN, R., und GAUTIER, M.
Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine.
Ann. genet. 1:41 (1959)
33. LEVAN, A., und BIESELE, J.J.
Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 71:1022-1053 (1958)
34. LYCETTE, R.R. et al.
Simplified culture techniques in chromosome analysis.
Lancet 12:1173 (1962)
35. MAITINSKY, S. Vogelköpfiger Zwergwuchs. Bericht über drei neue Fälle.
In Vorbereitung.
36. MATTHEY, R. Arch. Biol. 47 (1936)
Adv. in Genetics IV, 159:180 (1951)
37. MOORHEAD, P.S., et al.
Chromosome preparations of leucocytes from human peripheral blood.
Exper. Cell. Res. 20:613 (1960)
38. MONTGOMERY, T.H.
J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 15 (1912)
39. PAINTER, S. J. Exper. Zool. 37:291-321 (1923)
40. PAINTER, T.S. Rec. 2nd. Int. Eugenics Congress (1921)
41. PAINTER, T.S. Anat. Rec. (1922)
42. PAINTER, T.S. Amer. Naturalist 58:506-524 (1924)

43. PATAU, J. The identification of individual chromosomes,
especially in man.
Am. J. Hum. Genet. 12:250-276 (1960)
44. PATAU, J. Chromosome identification and the Denver
report.
Lancet 1:933-935 (1961)
45. PENROSE, L.S., et al.
Chromosomal translocation in mongolism
and in normal relatives.
Lancet 2: 409 (1960)
46. POLANI, P.E. Turner's Syndrome and allied conditions,
clinical features and chromosome aberrations
British Med. Bull. 17:200 (1961)
47. POLANI, P.E., et al.
A mongol girl with 46 chromosomes
Lancet 1:721 (1960)
48. ROBBINS, J.H., und WACHTEL, A.W.
Elektrophoretic heterogeneity of Phyto-
haemagglutinin.
Lancet 8:406 (1963)
49. ROSS, A. Removal of silver bromide grains in auto-
radiographic studies
The Human Chromosome Newsletter 10:17 (1963)
50. ROTHFELS, K.A., SIMINOVITCH, L.
Stain. Techn. 33:73 (1958)
51. SCHIFFER et al.
Acridine orange as a chromosome stain.
Lancet 2:1362-1363 (1961)
52. STEWART, A.M. und KEMP, N.H.
Apparatus to aid human chromosome analysis
Lancet 11:916 (1962)
53. TJIO, J.H., und LEVAN, A.
The chromosome number of man.
Hereditas 42:1 (1956)
54. TJIO, J.H. und PUCK, T.T.
J. exp. Med. 108:259 (1958)
55. TJIO, J.H. und PUCK, T.T.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)44:1229 (1958)
56. WARKANY, et al.
Chromosome analysis in a children's hospital
Selection of patients and results of studies
Pediatrics 33:2, 290-305, (1964)

57. WECHSLER, B. Peripheral blood culture on coverslips for
the karyotype study.
The Human Chromosome Newsletter 11:20 (1963)
58. WINIWARTER, H.v.
Arch. Biol. 27 (1912)

Zu besonderem Dank bin ich Seiner Magnifizenz
Herrn Professor Dr. G. WEBER und Herrn Oberarzt
Priv.-Doz. Dr. D. VOGT für die Überlassung des
Themas und die Unterstützung dieser Arbeit ver-
pflichtet.

LEBENS LAUF

Ich bin am 22.9.1936 als Tochter des Buchantiquars Dr. phil. Pablo Keins und seiner Ehefrau Dr. med. dent. Gertrud Keins geb. Lebermann in Buenos Aires geboren. Nachdem ich 7 Jahre die Pestalozzi Volksschule besuchte absolvierte ich das Gymnasium wo ich im Dezember 1954 die Reifeprüfung ablegte. Im März 1955 immatrikulierte ich in die Universidad Buenos Aires, Facultad de Medicina wo ich 6 Semester Kinesiologia studierte. Im April 1958 heiratete ich Steven Maitinsky und lebte danach mit meinem Mann in New York. Wir kamen im Oktober 1958 nach München um Medizin zu studieren. Im März 1961 habe ich die ärztliche Vorprüfung bestanden. Im Oktober 1961 ist hier unsere Tochter geboren. Ich habe am 2. März 1964 mit dem ärztlichen Staatsexamen begonnen.

